

PCT/EP 03/06745
 Rec'd PCT/PTO 29 DEC 2004

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 05 NOV 2003

WIPO

PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: Invenzione Industrial
 N. MI2002 A 001455



EPO - Munich
 83

14. Okt. 2003

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
 depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
 risultano dall'accusato processo verbale di deposito.

ma, li 1. AGO. 2003

per IL DIRIGENTE
 Paola Gianni
 Dr.ssa Paola Giuliano

PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(a) OR (b)

Best Available Copy

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA MI2002A 001455

REG. A

02/07/2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI DEPOSITO

DATA DI RILASIO

11/11/11

D. TITOLO

"Formulazioni fosfolipidiche di lexitropsine, loro preparazione ed impiego terapeutico"

E. RIASSUNTO

Formulazioni farmaceutiche costituite da un complesso fosfolipidico (liposomi, micelle, nanoparticelle ecc.) contenente lexitropsine, presentano proprietà farmacologiche ottimali rispetto ad altre formulazioni, per l'impiego sia locale sia parenterale degli agenti antiinfettivi o antitumorali di questa classe di sostanze.

M. DISEGNO



37 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

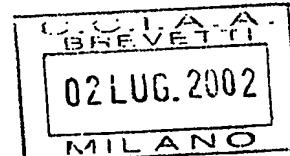
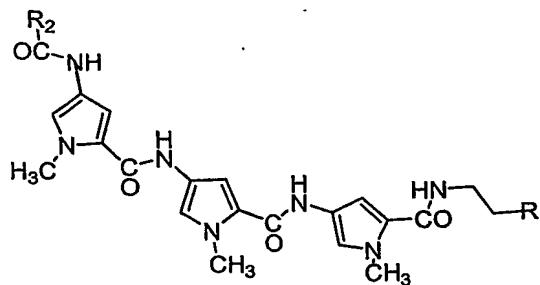
B/mc "FORMULAZIONI FOSFOLIPIDICHE DI LEXITROPSINE, LORO
PREPARAZIONE ED IMPIEGO TERAPEUTICO"

a nome : 1. ARCAMONE FEDERICO 2. CITERNESI UGO RAFFAELLO
residenti in: 1. Nerviano (Milano) 2. Arcore (Milano)

* * MI 2002 A 001455

La presente invenzione si riferisce a formulazioni farmaceutiche costituite da una fase fosfolipidica contenente una lexitropsina e l'impiego delle stesse per il trattamento di infezioni locali o generalizzate nonché di affezioni tumorali dell'uomo e degli animali. Tali formulazioni presentano proprietà farmacologiche ottimali rispetto ad altre formulazioni sia per l'uso locale che parenterale degli agenti antiinfettivi od antitumorali della classe delle lexitropsine.

Oggetto della presente invenzione sono infatti la preparazione e l'impiego terapeutico di formulazioni liposomiali, micellari, o più generalmente costituite da un complesso fosfolipidico, contenenti una lexitropsina di formula generale I



I

in cui R₁ è un gruppo basico come una funzione ammidinica, semplice o sostituita, una funzione amminica secondaria o terziaria, un gruppo ammonico.

quaternario, un gruppo guanidinico semplice o sostituito:

-C(NH)NH₂, -C(NH)NHR₃, -NH₂, NHR₃ -N(R₃)₂, -NR₃R₄, -NH-C(NH)NH₂, -NH-C(NH)NHR₃, -N(CH₂)₄, -N(R₃)₃+

mentre R₂ rappresenta un gruppo acilico alifatico od aromatico od arilalifatico, anche se sostituito con gruppi contenenti uno o più atomi di ossigeno, azoto, oppure R₂ rappresenta una sequenza di uno o più resti dell'acido 1-metil-4-ammino-pirrolo-2-carbossilico acilati o no all'estremità N-terminale, oppure terminanti con un residuo dell'acido 1-metil-4-carbossammido-pirrolo-2-carbossilico, oppure residui di analoghi amminoacidici derivati da un eterociclo diverso dal pirrolo, come furano, imidazolo, tiofene, tiazolo, o derivati del benzene (bz), della piridina (pd), di una diazina, della pirimidina, sostituiti alla posizione N-terminale con un residuo acilico, oppure contenenti, al posto del gruppo amminico N-terminale libero od acilato, un gruppo carbossammidico; e R₃ ed R₄ rappresentano gruppi alchilici C1-C4 eguali o diversi fra loro.

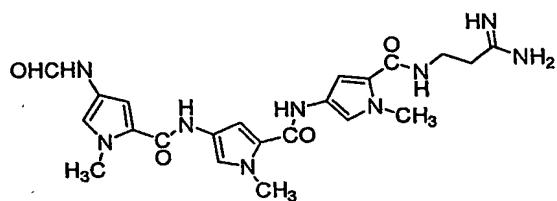
AREA DELL'INVENZIONE

Nella terapia di molte malattie che affliggono l'uomo e gli animali è altamente auspicabile realizzare ulteriori progressi al fine di ottenere trattamenti più efficaci ed esenti da effetti collaterali non desiderati. Questo è vero, per esempio, nel caso delle malattie virali e tumorali, delle malattie parassitarie, fra cui la malaria si evidenzia per il numero di vittime che miete nei paesi sottosviluppati e non solo in questi e nelle infezioni batteriche, a seguito dello svilupparsi di fenomeni di resistenza ed il verificarsi di forme di ridotta difesa immunitaria in pazienti affetti da AIDS o sotto chemioterapia antitumorale.

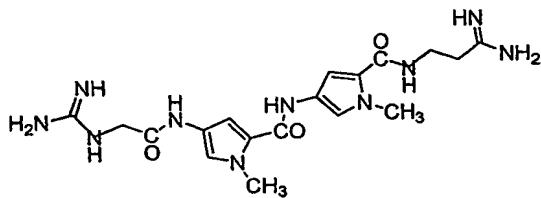
La disponibilità di principi attivi potenzialmente efficaci non sempre è sufficiente a risolvere i problemi terapeutici per motivi connessi con la loro stabilità e la biodisponibilità. Da qui deriva la esigenza di disporre di appropriate formulazioni oggi non disponibili. Questo è il caso delle lexitropsine, utili per il trattamento di affezioni gravi, come quelle dovute all'infezione virale od allo sviluppo di tumori, di infezioni protozoarie o batteriche. Nel testo che segue viene presentata una originale soluzione dei problemi connessi con la biodisponibilità di queste sostanze che vengono, secondo la nostra invenzione, utilizzate in forma di complesso fosfolipidico, preferibilmente costituito da un sistema liposomiale. I liposomi si formano spontaneamente quando lipidi anfipatici vengono dispersi in un eccesso di acqua (Liposome Methodology, vol. 107, Leserman & Barbet editori, Ediz, INSERM, Parigi, 1982). Le molecole lipidiche si dispongono in modo da esporre le teste polari verso la fase acquosa e le catene alchiliche idrofobiche appiccicate tra loro sì da formare un doppio strato che, assumendo una forma sferica conduce alla formazione di una fase interna separata dal resto della fase acquosa.

Le lexitropsine sono composti caratterizzati dalla presenza del residuo dell'acido 1-metil-4-amminopirrolo-2-carbossilico come unità monomerica in una struttura di tipo peptidico lineare generalmente provvista, all'estremità C-terminale, di una funzione basica come un'ammidina od una ammina o guanidina sostituite, ed all'estremità N-terminale, di un residuo acilico di varia natura oppure di un gruppo formammidinico. Le lexitropsine possono essere sia prodotti di origine microbica che loro analoghi sintetici. In quest'ultimo caso il residuo dell'acido 1-metil-4-ammino-pirrolo-2-

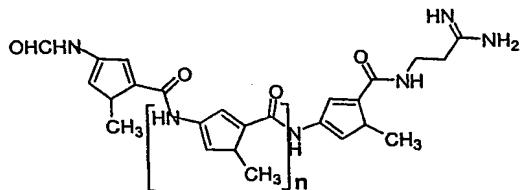
carbossilico può essere sostituito da un diverso derivato contenente un anello eterociclico od aromatico. Alcuni esempi di strutture chimiche (Formule II-VIII a-i) sono riportati qui di seguito. Le lexitropsine sono caratterizzate da interessanti ed utili proprietà farmacologiche: sono presenti nel gruppo strutturalmente definito sopra attività antivirali, antitumorali, antibatteriche e antiprotozoarie.



II

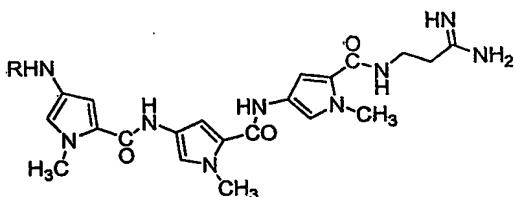


III



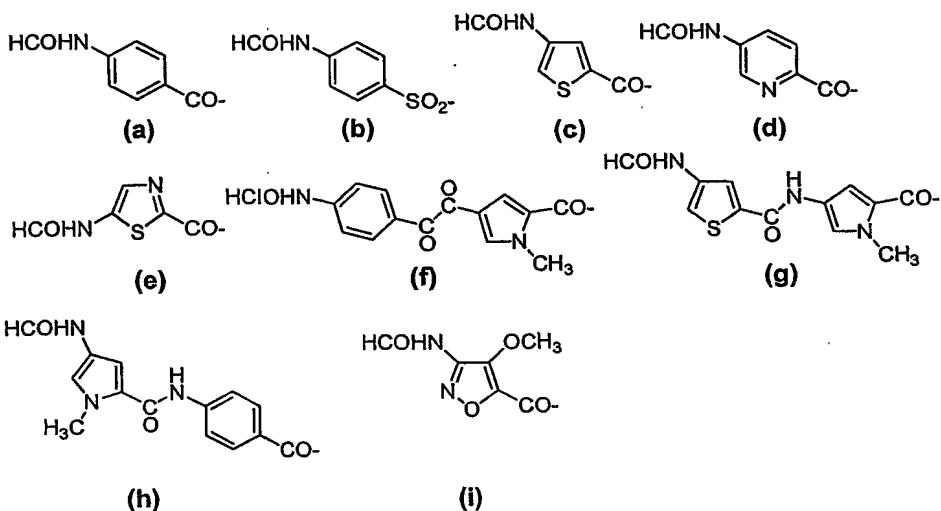
IV ($n=0$); V($n=2$); VI ($n=3$); VII ($n=4$)





VIII a-i

Significati di R:



CONOSCENZE PREGRESSE

La letteratura scientifica riguardante le lexitropsine è oggi molto vasta, ma nessuna rivendicazione brevettuale è stata precedentemente fatta riguardo formulazioni liposomiali o in generale riguardo formulazioni basate sulla formazione di un complesso fosfolipidico quale quello oggetto della presente invenzione. Per quanto concerne i principi attivi, essi risultano oggetto di precedenti invenzioni: Distamycin and distacins, F. Arcamone et al., *Ger. Offen. 1039198 (Sept. 18, 19587)*, *CA 55, 2012f. Pyrroles*, F. Arcamone et al. *Belg. Pat. 666612 (Nov. 3, 1965)*, *CA 65, 5444d Preparation of distamycin derivatives as antiviral, antitumor agents*, F. Animati et al. *PCT Int. Appl. WO 92 9,574 (Jun 11, 1992)*, *CA 117, 130993. Preparation of distamycin analogs as antiviral and antitumor agents*, F. Animati et al. *PCT Int. Appl. WO 92*

14,707 (Sep 3, 1992), CA 118, 38687; Preparation of Distamycin A derivatives as antimalarials. F. Animati et al., *PCT Int. Appl. WO 94 25,436 (Nov. 10, 1994), CA 122, 105530.*

Letteratura scientifica riguardante le lexitropsine oggetto della presente invenzione: Distamycin A. I. Isolation and structure of the antiviral agent distamycin A, F. Arcamone et al. *Gazz. Chim. Ital.*, **97**, 1097-1109 (1967); Distamycin A. II. Total synthesis, S. Penco et al., *ibid.*, **97**, 1110-1115 (1967). Distamycin A. III. Synthesis of analogs with modifications in the side chains, F. Arcamone et al., *Gazz. Chim. Ital.*, **99**, 620-631 (1969). Distamycin A. IV. Synthesis of analogs with different numbers of 1-methyl-4-aminopyrrole-2-carboxylic acid residues, F. Arcamone et al., *Gazz. Chim. Ital.*, **99**, 632-640 (1969). Synthesis, DNA binding and antiviral activity of distamycin analogs containing different heterocyclic moieties, F. Arcamone et al. *Anticancer Drug Design*, **1**, 235-44 (1986). Biological activity and DNA sequence specificity of synthetic carbamoyl analogues of distamycin. A. Alfieri et al., *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, **8**, 243-254 (1997).

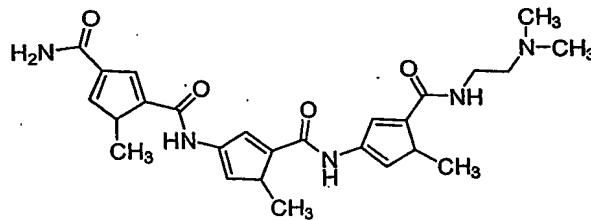
DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce a formulazioni farmaceutiche costituite da una fase fosfolipidica contenente una lexitropsina e l'impiego delle stesse per il trattamento di infezioni locali o generalizzate nonché di affezioni tumorali dell'uomo e degli animali. Tali formulazioni presentano proprietà farmacologiche ottimali rispetto ad altre formulazioni sia per l'uso locale che parenterale degli agenti antiinfettivi od antitumorali della classe delle lexitropsine.

Oggetti tipici della presente invenzione sono preparazioni liposomiali o

micellari o complessi fosfolipidici della distamicina (anche denominata stallimicina, formula II) o della netropsina (formula III) oppure di un analogo come i composti IV-VIII a-i per l'impiego topico in affezioni virali o tumorali localizzate. Un altro oggetto tipico della presente invenzione è la preparazione e l'uso per via parenterale di liposomi contenenti un composto di formula IX oppure X, oppure un analogo di essi compreso nella formula generale I per il trattamento terapeutico di malattie infettive o tumorali nell'uomo. Il composto di formula X è noto per una attività antiprotozoaria ed antimalarica che viene significativamente potenziata dalla formulazione qui descritta e quindi utilizzabile per il trattamento di malattie dell'uomo e degli animali dovute agli agenti infettanti ad esso sensibili.

Una ulteriore serie di derivati utilizzati ai fini della presente invenzione, sono i composti di formula generale XI, di per sé presentanti interessante attività antivirale ed antibatterica, la cui efficacia terapeutica risulta marcatamente aumentata mediante l'impiego della formulazione liposomiale oggetto della presente invenzione.



IX

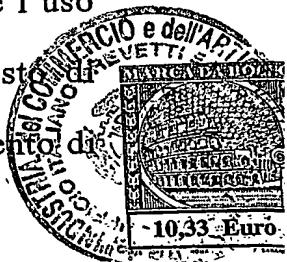
Una realizzazione della presente invenzione è dunque la preparazione di liposomi multilamellari, costituiti da fosfatidil glicerolo (PG), fosfatidil colina (PC) e colesterolo (C), contenenti una lexitropsina in percentuale compresa tra l'1.0 e il 10% della massa del liposoma.

Un'ulteriore oggetto della presente invenzione è la preparazione di vescicole lipidiche costituite da polietilenglicol fosfatidil etanolammina (PEG-PE), PG e fosfatidilcolina di uovo parzialmente idrogenata (PHEPC) contenenti dall'1 al 10% di una lexitropsina.

Oggetto della presente invenzione è anche l'ottenimento dei succitati liposomi multilamellari contenenti una lexitropsina in forma sterile e apirogena.

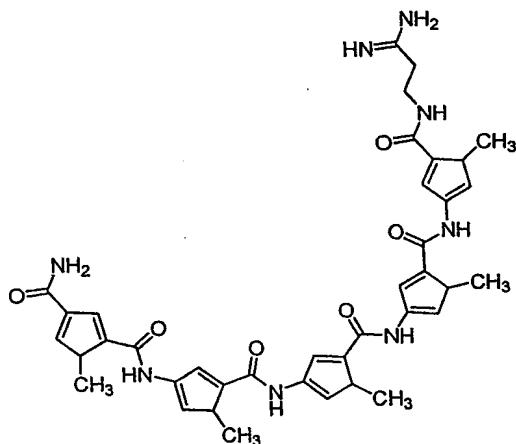
Un oggetto preferito della presente invenzione è costituito da formulazioni liposomiali come sopra descritte contenenti in particolare le lexitropsine di formula I.

Oggetto della presente invenzione è anche l'impiego topico in affezioni virali o tumorali localizzate di preparazioni liposomiali o micellari o complessi fosfolipidici della distamicina II o di un suo analogo come ad esempio III, IV, V, VI, VII, VIIIa-i, IX, X, XI, restando inteso che la presente invenzione non è limitata all'impiego degli specifici composti qui indicati. Un ulteriore, e specifico, oggetto della presente invenzione è anche l'impiego terapeutico di formulazioni sterili liposomiali, micellari, o costituite da un complesso fosfolipidico contenenti una lexitropsina di formula generale I, nel trattamento per via parenterale di infezioni locali o generalizzate nonché di affezioni tumorali dell'uomo e degli animali. Tali formulazioni presentano proprietà farmacologiche ottimali rispetto ad altre formulazioni sia per l'uso locale che parenterale degli agenti antiinfettivi od antitumorali della classe delle lexitropsine. Pertanto, uno specifico oggetto della presente invenzione è l'uso per via parenterale di preparazioni di liposomi contenenti un composto di formula generale I, in particolare IX o X oppure XI, utili per il trattamento di

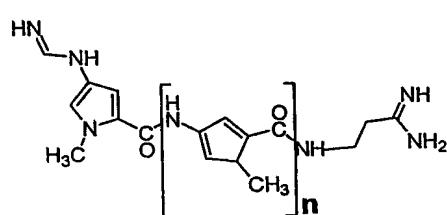


malattie virali. Inoltre, il composto di formula X è noto per la sua attività antiprotozoaria ed antimalarica. Questa viene significativamente potenziata dalla formulazione qui descritta ed è quindi utilizzabile per il trattamento di malattie dell'uomo e degli animali dovute agli agenti infettanti ad esso sensibili.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione è costituito dall'uso delle preparazioni sopra indicate per la produzione di formulazioni farmaceutiche aventi le attività terapeutiche qui sopra precise.



X



XI

ESEMPI

La presente invenzione viene esemplificata negli esempi che seguono. Si intende che essi non limitano l'invenzione, che deve intendersi estesa ad ogni lexitropsina di formula generale I apparentata con i composti specificamente riportati negli esempi, in particolare ad ognuno dei composti indicati con le formule II-X, ed alle diverse forme di complessazione come riportato negli esempi che seguono.

Esempio 1

Liposomi multilamellari vengono preparati mescolando 60 micromoli di

una miscela PG:PC:colesterolo (in cloroformio) nei rapporti molari 1:4:4 e aggiungendo 3 micromoli di una lexitropsina di formula generale I come sale di un acido organico od inorganico (preferibilmente il cloridrato) in metanolo. La miscela viene evaporata a temperatura ambiente in evaporatore rotante. Al residuo dell'evaporazione si aggiungono a 37° 10 ml di soluzione fisiologica tamponata con tampone Tris (idrossimetilaminometano e HCl) a pH 7.4 e la sospensione viene agitata a 37° per una notte.

La sospensione eterogenea di liposomi multilamellari così ottenuta viene estrusa attraverso un filtro poroso da 0.2-0.4 micron sotto una pressione di azoto di 40-80 psi a temperatura ambiente, quindi centrifugata a 130000 g per 1 h a 20°, al fine di separare i liposomi ed allontanare la lexitropsina non incapsulata. I liposomi vengono quindi dializzati contro 100-200 volumi di fisiologica a 37°. La sospensione viene liofilizzata.

La percentuale di lexitropsina incapsulata risulta essere superiore al 65% di quella di partenza.

Esempio 2

I liposomi ottenuti come descritti nell'esempio 1, vengono purificati anziché per centrifugazione e successiva dialisi, attraverso un processo di ultrafiltrazione, sia normale che tangenziale, usando membrane con cut-off compreso fra 1000 e 5000 Dalton di peso molecolare

Esempio 3

Si prepara una soluzione cloroformica contenente 50 mg ciascuno di fosfatidil glicerolo (PG), fosfatidil colina (PC), colesterolo (C). Questa soluzione viene evaporata in evaporatore rotante eliminando ogni traccia di solvente con una corrente di azoto. Il film lipidico risultante viene idratato con

3 ml di soluzione salina fisiologica contenente 30 micromoli di una lexitropsina di formula generale I come sale di un acido organico od inorganico (preferibilmente il cloridrato) agitando con un vibromixer ad intervalli di 30 secondi con riposo in bagno a 60° della stessa durata, per un tempo complessivo di 10 min. La sospensione liposomiale ottenuta viene sottoposta a trattamento con ultrasuoni in atmosfera di azoto per 2 min. quindi raffreddata in un bagno di acqua e ghiaccio per 1 min. I liposomi si recuperano per centrifugazione a 3000 giri/min. per 20 min e quindi liofilizzati. La resa di incapsulazione della lexitropsina è del 90%.

Esempio 4

I liposomi preparati come da esempio 3 vengono recuperati anzichè per centrifugazione, per ultrafiltrazione sia normale che tangenziale a cut-off compreso fra 1000 e 5000 Dalton.

Esempio 5

Liposomi multilamellari vengono preparati mescolando 60 micromoli di una miscela PG:PC:colesterolo (in cloroformio) nei rapporti molari 1:4:4 e aggiungendo 3 micromoli di una lexitropsina di formula generale I come sale con un acido organico od inorganico (preferibilmente il cloridrato) in metanolo. La miscela viene evaporata a temperatura ambiente in evaporatore rotante. Al residuo dell'evaporazione si aggiunge a 37° soluzione fisiologica tamponata con tampone a base di trisidrossimetilaminometano a pH 7.4 e la sospensione viene agitata a 37° per una notte.

La sospensione eterogenea di liposomi multilamellari così ottenuta viene estrusa attraverso un filtro poroso da 0.2-0.4 micron sotto una pressione di azoto di 40-80 psi a temperatura ambiente, quindi centrifugata a 13000 g per 1

h a 20°, al fine di separare i liposomi ed allontanare la lexitropsina non incapsulata. I liposomi vengono quindi dializzati contro 100-200 volumi di fisiologica a 37°, sterilizzati per filtrazione, distribuiti sterilmente e apirogenicamente, alla dose voluta in flaconi per penicillina e liofilizzati sterilmente.

La percentuale di lexitropsina incapsulata risulta essere superiore al 65%.

Esempio 6

I liposomi preparati come da esempio 5, dopo estrusione dal filtro poroso vengono recuperati anzichè per centrifugazione e successiva dialisi, per ultrafiltrazione sia normale che tangenziale a cut-off compreso fra 1000 e 5000 Dalton, successivamente sono ripresi in soluzione fisiologica e sterilizzati per filtrazione normale quindi distribuiti sterilmente alla dose voluta e liofilizzati, sempre sterilmente.

Esempio 7

Si prepara una soluzione cloroformica contenente 50 mg ciascuno di fosfatidil glicerolo (PG), fosfatidil colina (PC), colesterolo (C). Questa soluzione viene evaporata in evaporatore rotante eliminando ogni traccia di solvente con una corrente di azoto. Il film lipidico risultante viene idratato con 3 ml di soluzione salina fisiologica contenente 30 micromoli di lexitropsina di formula generale I come sale di un acido organico od inorganico (preferibilmente il cloridrato) agitando con un vibromixer ad intervalli di 30 secondi con riposo in bagno a 60° della stessa durata, per un tempo complessivo di 10 min. La sospensione liposomiale ottenuta viene sottoposta a trattamento con ultrasuoni in atmosfera di azoto per 2 min. quindi raffreddata



in un bagno di acqua e ghiaccio per 1 min. I liposomi si recuperano per centrifugazione a 13000 giri/min. per 20 min e quindi, sospesi in soluzione fisiologica e infine distribuiti alla dose voluta in flaconi sterili tipo penicillin, in condizioni sempre di sterilità e apirogenicità e liofilizzati. La resa di incapsulazione è del 90%.

Esempio 8

I liposomi preparati come da esempio 7, dopo estrusione dal filtro poroso vengono recuperati anzichè per centrifugazione e successiva dialisi, per ultrafiltrazione sia normale che tangenziale a cut-off compreso fra 1000 e 5000 Dalton, successivamente sono ripresi in soluzione fisiologica e sterilizzati per filtrazione normale quindi distribuiti sterilmente alla dose voluta e liofilizzati in condizioni di sterilità.

Esempio 9

I lipidi formanti vescicole, costituiti da PEG-PE (polietilenglicol fosfatidil etanolammina), PG, PHEPC (partially hydrogenated egg phosphatidyl choline), e colesterolo, in un rapporto molare di 0.15:0.3:1.85:1 sono dissolti in cloroformio ad una concentrazione finale in lipidi di 25 micromoli di fosfolipidi/ml. La soluzione lipidica viene essiccata ad ottenere un film sottile e quindi idratata con una soluzione calda (60°C) di lexitropsina di formula generale I come sale di un acido organico od inorganico (preferibilmente il cloridrato), 10 mM in NaCl 0.9. L'idratazione è condotta con 1 ml di soluzione acquosa per 50 µmoli di fosfolipide. Il materiale lipidico viene idratato mediante 10 cicli di congelamento-disgelo usando azoto liquido ed un bagno di acqua calda. Il dimensionamento dei liposomi è ottenuto tramite estrusione attraverso due membrane di policarbonato Nuclepore, tre

cicli attraverso filtri di 0.2 micron, e 10 cicli attraverso filtri di 0.05 micron.

La dimensione finale dei liposomi è di ca. 100 nm di diametro. I liposomi così ottenuti vengono dializzati contro 50-100 vol. di soluzione glucosata 5% tre volte in un periodo totale di 24 h. Un quarto ciclo viene effettuato contro una soluzione di glucosio 5% portata a pH 6.5-7 per 1 h.

La frazione di farmaco non incapsulato viene eliminata attraverso il contatto con resina a letto misto anionico e cationico, successiva centrifugazione per 5 min. fino a completo ricupero della sospensione liposomiale. La sterilizzazione della miscela è ottenuta per passaggio attraverso una membrana da 0.45 micron ed i liposomi vengono liofilizzati e conservati a 5°.

Esempio 10

Liposomi multilamellari vengono preparati mescolando 60 micromoli di una miscela PG:PC:colesterolo (in cloroformio) nei rapporti molari 1:4:4 e aggiungendo 1.5 mg di distamicina cloridrato in metanolo. La miscela viene evaporata a temperatura ambiente in evaporatore rotante. Al residuo dell'evaporazione si aggiunge a 37° soluzione fisiologica tamponata con tampone Tris (idrossimetil amino metano) a pH 7.4 e la sospensione viene agitata a 37° per una notte.

La sospensione eterogenea di liposomi multilamellari così ottenuta viene estrusa attraverso un filtro poroso da 0.2-0.4 micron sotto una pressione di azoto di 40-80 psi a temperatura ambiente, quindi centrifugata a 13000 g per 1 h a 20°, al fine di separare i liposomi ed allontanare la distamicina non incapsulata. I liposomi vengono quindi dializzati contro 100-200 volumi di fisiologica a 37°. La sospensione viene liofilizzata.

La percentuale di distamicina encapsulata risulta essere superiore al 65%.

Esempio 11

I liposomi preparati come da esempio 10, dopo estrusione dal filtro poroso vengono recuperati anzichè per centrifugazione e successiva dialisi, per ultrafiltrazione sia normale che tangenziale a cut-off compreso fra 1000 e 5000 Dalton, successivamente sono ripresi in soluzione fisiologica e liofilizzati.

Esempio 12

Si prepara una soluzione cloroformica contenente 50 mg ciascuno di fosfatidil glicerolo (PG), fosfatidil colina (PC), colesterolo (C). Questa soluzione viene evaporata in evaporatore rotante eliminando ogni traccia di solvente con una corrente di azoto. Il film lipidico risultante viene idratato con 3 ml di soluzione salina fisiologica contenente 15 mg di distamicina cloridrato agitando con un vibromixer ad intervalli di 30 secondi con riposo in bagno a 60° della stessa durata, per un tempo complessivo di 10 min. La sospensione liposomiale ottenuta viene sottoposta a trattamento con ultrasuoni in atmosfera di azoto per 2 min. quindi raffreddata in un bagno di acqua e ghiaccio per 1 min. I liposomi si recuperano per centrifugazione a 13000 giri/min. per 20 min. e quindi liofilizzati. La resa di encapsulazione è del 90%.

Esempio 13

I liposomi preparati come da esempio 12, dopo trattamento con ultrasuoni, vengono recuperati anzichè per centrifugazione e successiva dialisi, per ultrafiltrazione sia normale che tangenziale a cut-off compreso fra 1000 e 5000 Dalton, successivamente sono ripresi in soluzione fisiologica e liofilizzati.

Esempio 14

I liposomi preparati come da esempio 7 vengono recuperati anzichè per centrifugazione, per ultrafiltrazione sia normale che tangenziale a cut-off compreso fra 1000 e 5000 Dalton.

Successivamente vengono sterilizzati per filtrazione, distribuiti sterilmente e liofilizzati, sempre sterilmente.

Liposomi multilamellari vengono preparati mescolando 60 micromoli di una miscela PG:PC:colesterolo (in cloroformio) nei rapporti molari 1:4:4 e aggiungendo 3 micromoli di composto X in metanolo. La miscela viene evaporata a temperatura ambiente in evaporatore rotante. Al residuo dell'evaporazione si aggiunge a 37° soluzione fisiologica tamponata con tampone Tris (idrossimetil amino metano) a pH 7.4 e la sospensione viene agitata a 37° per una notte.

La sospensione eterogenea di liposomi multilamellari così ottenuta viene estrusa attraverso un filtro poroso da 0.2-0.4 micron sotto una pressione di azoto di 40-80 psi a temperatura ambiente, quindi centrifugata a 130000 g per 1 h a 20°, al fine di separare i liposomi ed allontanare la lexitropsina non incapsulata. I liposomi vengono quindi dializzati contro 100-200 volumi di soluzione fisiologica a 37°, sterilizzati per filtrazione, distribuiti sterilmente e apirogenicamente, alla dose voluta in flaconi per penicillina e liofilizzati sterilmente. La percentuale di lexitropsina incapsulata risulta essere superiore al 65%.

Esempio 15

I liposomi preparati come da esempio 14, dopo estrusione dal filtro poroso vengono recuperati anzichè per centrifugazione e successiva dialisi, per



ultrafiltrazione sia normale che tangenziale a cut-off compreso fra 1000 e 5000 Dalton, successivamente sono ripresi in soluzione fisiologica e sterilizzati per filtrazione normale quindi distribuiti sterilmente alla dose voluta e liofilizzati, sempre sterilmente.

Esempio 16

Si prepara una soluzione cloroformica contenente 50 mg ciascuno di fosfatidil glicerolo (PG), fosfatidil colina (PC), colesterolo (C). Questa soluzione viene evaporata in evaporatore rotante eliminando ogni traccia di solvente con una corrente di azoto. Il film lipidico risultante viene idratato con 3 ml di soluzione salina fisiologica contenente 30 micromoli di composto X agitando con un vibromixer ad intervalli di 30 secondi con riposo in bagno a 60° della stessa durata, per un tempo complessivo di 10 min. La sospensione liposomiale ottenuta viene sottoposta a trattamento con ultrasuoni in atmosfera di azoto per 2 min. quindi raffreddata in un bagno di acqua e ghiaccio per 1 min. I liposomi si recuperano per centrifugazione a 13000 giri/min. per 20 min e quindi, distribuiti alla dose voluta in flaconi sterili tipo penicillina, in condizioni sempre di sterilità e aprogenicità e liofilizzati. La resa di incapsulazione è del 90%.

Esempio 17

I liposomi preparati come da esempio 17, dopo estrusione dal filtro poroso vengono recuperati anzichè per centrifugazione e successiva dialisi, per ultrafiltrazione sia normale che tangenziale a cut-off compreso fra 1000 e 5000 Dalton, successivamente sono ripresi in soluzione fisiologica e sterilizzati per filtrazione normale quindi distribuiti sterilmente alla dose voluta e liofilizzati, sempre sterilmente.

Esempio 18

I lipidi formanti vescicole, costituiti da PEG-PE (polietilenglicol fosfatidil etanolammina), PG, PHEPC (partially hydrogenated egg phosphatidyl choline), e colesterolo, in un rapporto molare di 0.15:0.3:1.85:1 sono dissolti in cloroformio ad una concentrazione finale in lipidi di 25 micromoli di fosfolipidi/ml. La soluzione lipidica viene essiccata ad ottenere un film sottile e quindi idratata con una soluzione calda (60°C) di composto X, 10 mM in NaCl 0.9. L'idratazione è condotta con 1 ml di soluzione acquosa per 50 µmoli di fosfolipide. Il materiale lipidico viene idratato mediante 10 cicli di congelamento-disgelo usando azoto liquido ed un bagno di acqua calda. Il dimensionamento dei liposomi è ottenuto tramite estrusione attraverso due membrane di policarbonato Nuclepore, tre cicli attraverso filtri di 0.2 micron, e 10 cicli attraverso filtri di 0.05 micron. La dimensione finale dei liposomi è di ca. 100 nm di diametro. I liposomi così ottenuti vengono dializzati contro 50-100 vol. di soluzione glucosata 5% tre volte in un periodo totale di 24 h. Un quarto ciclo viene effettuato contro una soluzione di glucosio 5% portata a pH 6.5-7 per 1 h.

La frazione di farmaco non incapsulato viene eliminata per contatto con una resina a letto misto (anionico/cationico). La miscela viene centrifugata per 5 min. fino a completo ricupero della sospensione liposomiale. La sterilizzazione della miscela è ottenuta per passaggio attraverso una membrana da 0.45 micron ed i liposomi vengono liofilizzati e conservati a 5°.

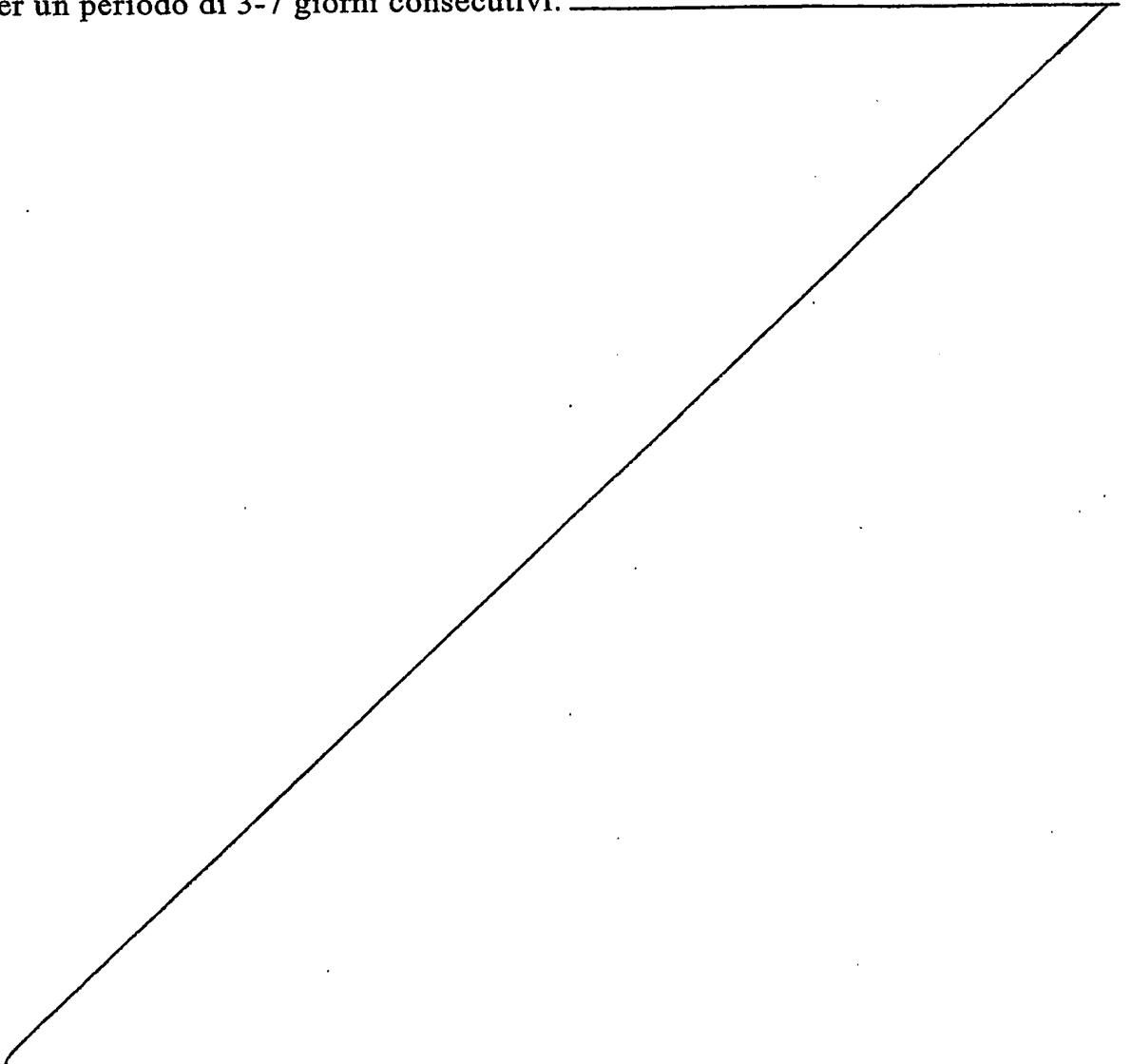
Esempio 19

Una formulazione di lexitropsina, ottenuta come descritto negli esempi 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, viene applicata sulla cute ammalata del paziente in

una quantità tale da avere una somministrazione topica di 5-50 mg di farmaco per ogni applicazione due-tre volte al giorno per un periodo di 3-7 giorni consecutivi.

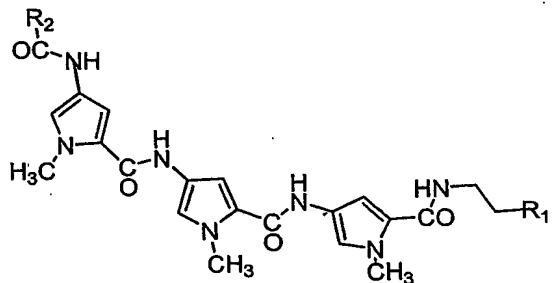
Esempio 20

Una formulazione di lexitropsina ottenuta come descritto negli esempi 5, 6, 7, 8, 14, 15, 16, 17, 18 viene iniettata per via parenterale (endovenosa oppure intramuscolare oppure intradermica) nel paziente affetto da malattia rispondente al farmaco in ragione di 5-500 mg per paziente una volta al giorno per un periodo di 3-7 giorni consecutivi.



RIVENDICAZIONI

1. Una formulazione fosfolipidica costituita da un sistema di rilascio e da una lexitropsina di formula generale I



I

in cui R_1 è un gruppo basico come una funzione ammidinica, semplice o sostituita, una funzione amminica secondaria o terziaria, un gruppo ammonico quaternario, un gruppo guanidinico semplice o sostituito:

-C(NH)NH₂, -C(NH)NHR₃, -NH₂, NHR₃, -N(R₃)₂, -NR₃R₄, -NH-C(NH)NH₂, -NH-C(NH)NHR₃, -N(CH₂)₄, -N(R₃)₃⁺

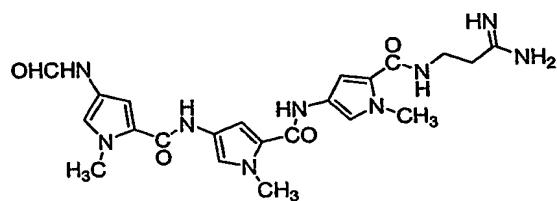
mentre R_2 rappresenta un gruppo acilico alifatico od aromatico od arilalifatico, anche se sostituito con gruppi contenenti uno o più atomi di ossigeno, azoto, oppure R_2 rappresenta una sequenza di uno o più resti dell'acido 1-metil-4-ammino-pirrolo-2-carbossilico acilati o no all'estremità N-terminale, oppure terminanti con un residuo dell'acido 1-metil-4-carbossammido-pirrolo-2-carbossilico, oppure residui di analoghi amminoacidici derivati da un eterociclo diverso dal pirrolo, come furano, imidazolo, tiofene, tiazolo, o derivati del benzene (bz), della piridina (pd), di una diazina, della pirimidina, sostituiti alla posizione N-terminale con un residuo acilico, oppure contenenti, al posto del gruppo amminico N-terminale libero od acilato, un gruppo carbossammidico; e R_3 ed R_4 rappresentano gruppi



alchilici C1-C4 eguali o diversi fra loro

in cui il sistema di rilascio può essere un liposoma, oppure una micella, o una nanoparticella, oppure un complesso fosfolipidico o comunque una struttura sovramolecolare contenente incluso un composto della formula generale **I**.

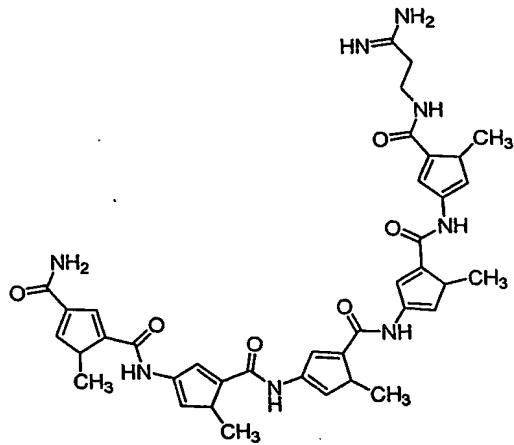
2. Una formulazione fosfolipidica secondo la rivendicazione 1, costituita da un sistema di rilascio e da un principio attivo costituito da un sale di distamicina di formula **II**



II

in cui il sistema di rilascio può essere un liposoma, oppure una micella, o una nanoparticella, oppure un complesso fosfolipidico o comunque una struttura sovramolecolare contenente incluso un sale di distamicina.

3. Una formulazione liposomiale secondo la rivendicazione 1, costituita da un sistema di rilascio liposomiale e da un principio attivo di formula **X**



X

in cui il sistema di rilascio può essere un liposoma, oppure una micella, o una nanoparticella, oppure un complesso fosfolipidico o comunque una struttura sovramolecolare contenente incluso un composto della formula X.

4. Una formulazione secondo la rivendicazione 1, contenente dal 0.1 al 10% di principio attivo di formula generale I, per il trattamento topico di infezioni microbiche, virali o protozoarie e per il trattamento di tumori localizzati.

5. Una formulazione secondo la rivendicazione 1, in forma iniettabile per il trattamento per via endovenosa o intramuscolare o intradermica di infezioni microbiche, virali, protozoarie generalizzate o di tumori metastatici, a dosaggi compresi tra 0.1 e 20 mg di lexitropsine salificate aventi formula generale I per kg di peso corporeo.

6. Una formulazione secondo la rivendicazione 2, contenente dal 0.1 al 10% di principio attivo costituito da un sale di distamicina di formula II per il trattamento topico di infezioni microbiche, virali o protozoarie e per il trattamento di tumori localizzati.

7. Una formulazione secondo la rivendicazione 2, in forma iniettabile, per il trattamento per via endovenosa o intramuscolare o intradermica di infezioni microbiche, virali, protozoarie generalizzate o di tumori metastatici, a dosaggi compresi tra 0.1 e 20 mg di un sale di distamicina di formula II per kg di peso corporeo.

8. Una formulazione secondo la rivendicazione 3, contenente dal 0.1 al 10% di principio attivo di formula generale X per il trattamento topico di infezioni microbiche, virali o protozoarie e per il trattamento di tumori localizzati.

9. Una formulazione secondo la rivendicazione 1, in forma iniettabile per il trattamento per via endovenosa o intramuscolare o intradermica di infezioni microbiche, virali, protozoarie generalizzate o di tumori metastatici, a dosaggi compresi tra 0.1 e 20 mg di un sale di lexitropsina di formula X per kg di peso corporeo.

Milano, 2 luglio 2002

Il Mandatario
(Bianchetti Marina)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

M.B. Bianchetti



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.